



**Luís Carlos Mesquita      Aplicação da Terapia Fotodinâmica no Processo de**  
**Ribeiro da Silva Teles      Esterilização de Sangue**



**Luís Carlos Mesquita  
Ribeiro da Silva Teles**

**Aplicação da Terapia Fotodinâmica no Processo de  
Esterilização de Sangue**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT, EU,  
QREN, COMPETE e FEDER às  
unidades de investigação do CESAM e  
QOPNA.

Dedico este trabalho ao meu avô

## **o júri**

presidente

**Doutora Luísa Seuanes Serafim**

professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Cristina Esteves**

professora convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida**

professora auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À Professora Doutora Adelaide, orientadora da tese, pelo apoio, compreensão, acompanhamento e total disponibilidade em todos os momentos.

À Professora Doutora Amparo Faustino, pelo apoio, interesse, críticas construtivas e pela paciência com que inúmeras vezes me ajudou a trocar a lâmpada da Lumacare.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental Aplicada, pelo companheirismo e amizade irei recordar com saudade e ternura os momentos divertidos que vivemos juntos.

Um especial agradecimento à Margarida, pelo apoio gigantesco, pelo amor e amizade sempre presentes. Um muito obrigado muito especial.

Por fim, mas não menos importante, um agradecimento muito especial aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional que permitiram tornar possível a concretização de mais este objetivo pessoal e ao Emanuel pelo apoio e carinho e por não me deixar nunca desistir.

## palavras-chave

Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT); Ftalocianinas; Porfirinas; produtos derivados do sangue; técnicas de desinfecção de sangue

## resumo

A importância médica do sangue associada ao risco de doenças infecciosas levou a um melhoramento das técnicas de rastreio de patogênicos no sangue doado. No entanto, devido aos períodos de "janela", durante o qual os agentes infecciosos não podem ser detetados, a desinfecção de sangue e seus derivados assume uma importância vital. Considerando que as técnicas convencionais de desinfecção (tratamento com solvente-detergente ou irradiação com UV ou radiação gama) pode ser empregue em concentrados de plasma ou de proteínas, o efeito colateral associado aos respetivos tratamentos não permite a sua utilização em frações celulares. Consequentemente, é necessário o desenvolvimento de uma nova alternativa eficaz para inativar microrganismos em sangue. Uma boa estratégia que merece ser considerada baseia-se na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). aPDT envolve a interação entre a luz e um fotossensibilizador (PS) na presença de oxigénio molecular. Esta interação produz espécies reativas de oxigénio (ROS), que causam danos oxidativos às moléculas microbianas necessárias à sobrevivência do microrganismo.

Em alguns países, esta metodologia já está aprovada para descontaminação de plasma, utilizando azul de metileno ou psoraleno como PSs.

O objetivo deste estudo foi avaliar a adequação de de estrutura do tipo ftalocianina (**Pc**) e porfirina (**Por**) para desinfecção fotodinâmica de hemoderivados. Plasma e sangue total foram infetados com  $10^8$  unidades formadoras de colónias (CFU) / mL de *Escherichia coli* e após incubação com os derivados **Pc** e **Por** em estudo, expostos respetivamente a luz vermelha ou a luz branca com uma irradiância de  $150 \text{ W/m}^2$  durante 270 min. As concentrações de *E. coli* viáveis foram determinadas a 0, 30, 60, 90, 180 e 270 min e comparadas com as obtidas nos controlos claro (amostras irradiadas na ausência de PS) e controlos escuro (amostras incubadas com PS mas não irradiadas). O efeito do tratamento aPDT nas células do sangue (glóbulos vermelhos e brancos) também foi avaliado.

Os resultados obtidos mostram que, em todos os componentes do sangue, a **Por** em estudo é mais eficaz na inativação de *E. coli* que o derivado **Pc**. Após o tratamento aPDT, o número de células vermelhas e brancas no sangue é semelhante aos valores observados nas amostras de controlo. A eficiente inativação de células de *E. coli* e a ausência de efeito sobre as células de sangue transformam os derivados porfirínicos e ftalocianinas potenciais candidatos a serem utilizados com fotossensibilizadores na desinfecção fotodinâmica de produtos derivados do sangue.

## keywords

antimicrobial photodynamic therapy (aPDT); phthalocyanines; porphyrins; blood products; blood disinfection techniques.

## abstract

The medical importance of blood combined with the risk of infectious diseases led to improve techniques for pathogen screening in donated blood. However, due to the “window” periods during which infective agents cannot be detected, the possibility of disinfecting blood and its derivatives assumes vital importance. Whereas conventional disinfection techniques (solvent-detergent treatment or ultra violet light irradiation) may be employed in plasma or protein concentrates, the collateral damage associated with such treatments disallows their use with cellular fractions. Consequently, new effective alternative approaches to inactivate microorganisms in blood are needed. A good strategy that merits to be considered is based on antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). aPDT involves the interaction between light and a photosensitizer (PS) in the presence of molecular oxygen. This interaction produces reactive oxygen species (ROS) which cause oxidative damage to microbial vital molecules.

In some countries this methodology is already approved for plasma decontamination, using methylene blue or psoralen as PSs.

The aim of this study was to evaluate the suitability of phthalocyanines (**Pc**) and porphyrins (**Por**) for the photodynamic disinfection of blood products. Plasma and whole blood were infected with  $10^8$  colony forming units (CFU/mL) of *Escherichia coli* and exposed during 270 min to either red light, for **Pcs**, or white light, for **Pors** (150 W/m<sup>2</sup>). The concentration of viable *E. coli* was determined at 0, 30, 60, 90, 180 and 270 min and compared with light (irradiated in the absence of PS) and dark (incubated with PS but non-irradiated) controls. The effect of the aPDT treatment on blood cells (red and white blood cells) was also evaluated.

The results show that the studied Por is more effective in the photoinactivation of *E. coli* than the Pc, in all components of blood. After treatment, the number of red and white blood cells is similar to the ones of control samples. The effective reduction of *E. coli* and the absence of side effect on blood cells demonstrate that it is possible to use Pc and Por as potential photosensitizers for photodynamic disinfection of blood products.

## Índice

<b>Capítulo 1: Introdução</b>	1
<b>Sangue e seus subprodutos</b>	1
Plasma Fresco Congelado (PFC)	1
Concentrado de Plaquetas (CP)	2
Concentrado de Hemácias (CH)	2
Crioprecipitado (CRIO)	3
<b>Medicina Transfusional/ Imuno-Hemoterapia</b>	4
<b>Risco de Transmissão Microbiológica por Transfusão Sanguínea</b>	5
<b>Hemovigilância</b>	8
<b>Tratamentos Convencionais</b>	9
<b>Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Esterilização de Sangue e seus Componentes</b>	10
<b>Novas abordagens de Desinfecção</b>	12
<b>Terapia Fotodinâmica (PDT)</b>	12
<b>Aplicação Clínica do Processo Fotodinâmico</b>	14
Mecanismos de ação da PDT	15
<b>Fotossensibilizadores e Fotoprocso</b>	16
Eritrócitos como modelos experimentais em PDT	18
Ftalocianinas e Porfirinas na inativação microbiana em sangue	19
<b>Fonte de Luz</b>	24
<b>Controlos</b>	24
<b>Objetivos</b>	25
<b>Capítulo 2: Application of phthalocyanines and porphyrins in blood sterilization</b>	26
<b>Capítulo 3: Conclusões</b>	41
<b>Bibliografia</b>	42



## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Número de dádivas homólogas recusadas (após entrevista médica) .....	6
Tabela 2: Número de unidades inutilizadas dos diferentes componentes sanguíneos produzidos. ....	6
Tabela 3: Análise de doenças infecciosas: Hepatite B; C e HIV. ....	7
Tabela 4: Resultados dos testes serológicos para a Sífilis. ....	7
Tabela 5: Número de doadores positivos para HTLV I e II. ....	7
Tabela 6: Número de casos positivos para HIV. ....	7
Tabela 7: Métodos convencionais para a redução da carga microbiana nos três principais componentes sanguíneos. ....	10

## **Lista de Figuras**

Figura 1: Estrutura do azul-de-metileno.....	21
Figura 2: Estrutura geral dos psoralenos (I) e do amotosaleno (II).....	22
Figura 3: Estrutura da Riboflavina Vitamina B <sub>2</sub> .....	23

## **Abreviaturas**

aPDT – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (antimicrobial Photodynamic Therapy);

CFU – Unidades Formadoras de Colónias (Colonies forming unit);

CH – Concentrado de hemácias (concentrate of erythrocytes);

CMV – Citomegalovírus;

CP – Concentrado de Plaquetas;

CPD – solução de Fosfato Citrato e Dextrose

CRIO – Crioprecipitado (Cryoprecipitate);

EPP – Protoporfíria eritropoética (Erythropoietic protoporphyria).

HBs – anticorpos contra os antígenos de superfície do vírus da hepatite B;

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana;

HTLV – Vírus de células T linfotrófica humana;

IPST – Instituto Português de Sangue e Transplantação;

MB – Azul de metileno (Methylene Blue);

Pcs – Ftalocianinas (Phthalocyanines);

PDT – Terapia Fotodinâmica (Photodynamic Therapy);

PFC – Plasma fresco congelado;

Por – Porfirinas (porphyrin);

PS – Fotossensibilizador (Photosensitizer);

RF- Riboflavina;

ROS – Espécies reativas de oxigénio (Reactive Oxygen species);

UE – União Europeia;

UV – Ultra-violeta;

VHC – Vírus da Hepatite C;

## Capítulo 1: Introdução

---

### Sangue e seus subprodutos

O sangue é por definição o sistema de suporte da vida, contendo as células necessárias ao aporte de oxigénio para os tecidos, à identificação e inativação dos microrganismos patogénicos; à cicatrização de feridas, além de todas as proteínas necessárias aos processos de reparação teciduais. Usando modernas técnicas de separação é possível fracionar o sangue com vista à obtenção de diversos produtos úteis em termos terapêuticos. O sangue doado pode ser fracionado em três componentes principais: plasma fresco congelado; concentrados de plaquetas; concentrado de hemácias e crioprecipitado.

Até ao final da década de 70, a grande maioria do sangue era transfundido sem ser processado nos seus diferentes componentes, sendo por isso, definido como “sangue total”. A prática corrente na maioria dos países da UE é processar quase todas as dádivas em hemácias, plaquetas e plasma. (1)

O processo típico de colheita da dádiva de sangue consiste na colheita de 450-500 mL de sangue do dador para uma embalagem de plástico contendo 63 mL de solução conservante e anticoagulante, geralmente constituída pelos sais de Citrato Fosfato e Dextrose (CPD) ou CPD-adenina. O citrato, por se ligar ao cálcio, atua como um bloqueador da cascata de coagulação; a glucose e a adenina são responsáveis pela manutenção do metabolismo das hemácias durante o armazenamento.(1) A unidade de sangue é posteriormente filtrada para remoção completa dos leucócitos. A maior parte do plasma é removido e é adicionado aos eritrócitos uma solução aditiva (glicerol) com vista à manutenção do seu metabolismo durante o período de armazenamento.(1) Em Portugal, a remoção de leucócitos é obrigatória em todos os componentes. (1)

### Plasma Fresco Congelado (PFC)

Constitui a fase aquosa do sangue, fração que contém as proteínas e fatores necessários, por exemplo, à coagulação.(2) O plasma é frequentemente congelado logo após a sua

separação e descongelado imediatamente antes da sua utilização. O plasma fresco congelado (PFP) é armazenado a -18 °C e tem uma validade de cinco anos. As taxas de infecção são mais elevadas nas frações do plasma ou nos seus derivados do que nos concentrados de eritrócitos, uma vez que resultam da combinação de plasmas de diferentes proveniências.(3) Este componente é obtido a partir de sangue total, pela sua separação e congelamento, até 8 h após colheita. O volume final é de aproximadamente de 170 mL.(4, 5)

#### Concentrado de Plaquetas (CP)

As plaquetas são unidades utilizadas em situações de distúrbios da coagulação. São obtidas por concentração a partir de sangue total e podem ser armazenadas por um período de três dias a 22 °C em agitação constante. (6, 7) As plaquetas obtidas nesta situação são concentradas a partir de múltiplas dádivas, (até pelo menos cinco dádivas), de forma a obter um volume de plaquetas por unidade a administrar suficiente para ter efeitos terapêuticos. Este volume é de aproximadamente 200 mL e deve conter no mínimo  $3,0 \times 10^{11}$  plaquetas. O concentrado de plaquetas é pois preparado a partir da centrifugação de uma unidade de sangue total, obtendo-se no final do processo um volume de aproximadamente 50 a 70 mL que deve conter, no mínimo  $5,5 \times 10^{10}$  plaquetas por dávida.(4) As plaquetas sofrem, posteriormente, leucoredução por irradiação com raios gama na dose de 25 Gy. O concentrado de plaquetas pode ainda ser obtido por colheita de aférese a partir de um único dador. (4, 5)

#### Concentrado de Hemácias (CH)

Os concentrados de hemácias são unidades terapêuticas utilizadas no tratamento de situações clínicas de hipoxia por perda de sangue após trauma ou cirurgia. Os concentrados de hemácias podem ser armazenados entre 4-6 °C durante 35 dias.(3, 4) Estes componentes são preparados a partir de uma unidade de sangue total através da remoção de aproximadamente, 130 a 230 mL de plasma, apresentando um volume final de 220 a 320 mL bem como um valor de hematócrito que varia entre 65 a 80%.(4) Após leucoredução,

estes CH são também submetidos a radiação gama com irradiador específico para sangue, na dose 25 Gy (4, 5) Em alternativa ao processo anterior de irradiação, as hemácias podem ser lavadas com solução salina estéril e que após centrifugação permite remover quantidades significativas de restos celulares, potássio, plasma, plaquetas e leucócitos.(8) Após este processo, este hemocomponente designa-se por concentrado de hemácias lavadas e apresenta um prazo de validade de 24 h quando armazenado a 2-6 °C.(4)

### Crioprecipitado (CRIO)

O crioprecipitado é obtido a partir do descongelamento até 4 °C de uma unidade de PFC, retirando depois cerca de 10-15 mL do plasma sobrenadante e re-congelando a -20 °C. Após descongelamento é retirado o restante plasma, tendo no final um volume por unidade de 10-30 mL.(4) O descongelamento é efetuado em banho-maria num sistema de micro-ondas a uma temperatura entre 30 a 37 °C. Uma vez descongelado, pode ser armazenado entre 1-6 °C até 6 h. (4)

Os leucócitos são completamente removidos de todas as frações através de filtração, uma vez que são responsáveis por iniciar respostas imunes no recetor, tais como a doença do enxerto-*versus* hospedeiro. Este processo de leucoredução é efetuado como referido através de filtração dos leucócitos e radiação gama e previne o desenvolvimento de reação transfusional não-hemolítica; o desenvolvimento de aloimunização em pacientes politransfundidos e ainda a transmissão da infeção pelo citomegalovírus (CMV). (4)

Os organismos tipicamente associados às várias fracções de hemocomponentes incluem: vírus com invólucro lipídico e sem invólucro como o HIV-1, vírus da Hepatite e parvovirus, que podem estar presentes em todos os hemocomponentes; bactérias como os *Staphylococcus spp.* em plaquetas; *Pseudomonas spp.* e *Yersinia enterocolitica* em eritrócitos, entre outros.(3, 9, 10) De facto todos os hemocomponentes são capazes de transmitir agentes patogénicos. Perspectivando a esterilização destes hemocomponentes, o ideal seria um tratamento que pudesse ser aplicado a todos estes hemocomponentes e a todos os tipos de microrganismos. Existem contudo, em termos práticos muitos fatores que o condicionam. A primeira dificuldade surge devido às distintas matrizes que apresentam

os diferentes hemocomponentes. Enquanto o plasma é fundamentalmente uma solução aquosa onde estão se encontram proteínas em suspensão; as plaquetas e os eritrócitos apresentam natureza celular. Consequentemente, se um microrganismo infeccioso apresenta diferenças físicas e morfológicas consideráveis relativamente a uma proteína plasmática, o mesmo não ocorre com os componentes celulares do sangue. Além disso, a localização do agente patogénico varia consoante a fração processada, isto é, no plasma o microrganismo encontra-se em suspensão enquanto nos concentrados de plaquetas e de eritrócitos, os microrganismos podem estar em suspensão ou associados às células apresentando uma localização intra ou extracelular.(3)

Qualquer tratamento proposto para a desinfecção de sangue, tal como acontece com qualquer outro produto para uso farmacêutico, deve apresentar o mínimo risco para as células hospedeiras.(3) O ideal seria o desenvolvimento de um tratamento para o plasma e frações celulares que inativasse simultaneamente todos os microrganismos e realizasse a leucoredução sem danificar as proteínas plasmáticas, as plaquetas e os eritrócitos.(3) Além disso, os agentes ativos usados devem ser, após tratamento, facilmente removidos ou apresentarem baixos valores de toxicidade celular. (3)

### Medicina Transfusional/ Imuno-Hemoterapia

A Imuno-Hemoterapia é uma área diferenciada e multidisciplinar da medicina laboratorial, responsável pela atividade da Medicina Transfusional. O Serviço de Sangue e a Medicina Transfusional têm por missão garantir a disponibilidade e a acessibilidade de sangue e componentes sanguíneos e derivados do plasma de qualidade, seguros e eficazes. (4)

A Imuno-hemoterapia dedica-se portanto, ao tratamento de doenças através da utilização de sangue ou derivados.

O processo clínico transfusional pode ser definido como a transfusão de uma unidade de sangue para o doente correto, no momento correto e nas condições corretas de acordo com as *guidelines* apropriadas. (1) Segundo estas *guidelines*, o uso ótimo do sangue ocorre quando este é utilizado de forma segura (sem reações adversas ou infeções), quando é

cl clinicamente eficaz (apresenta benefcios para o doente) e eficiente (sem se efetuarem transfusões desnecessárias). (1)

Dada a preocupação dos sistemas de saúde com a eficácia dos cuidados prestados, a cadeia processual da transfusão sanguínea tem sido objeto de procedimentos legais em diversos países do mundo. (1)

O sangue é um tecido precioso e um recurso escasso para muitos países que apresentam dificuldades em responder às necessidades de sangue e seus componentes. Na União Europeia (UE), a disponibilidade destes componentes depende totalmente da dádiva voluntária, por isso existe atualmente todo o interesse em demonstrar aos doadores que cada dádiva é conscienciosa e eficazmente usada. (1, 11)

Os problemas associados à diminuição da disponibilidade de sangue são fundamentalmente resultado do envelhecimento da população e da introdução de novas medidas de prevenção, em relação à segurança do destinatário.(1)

A transfusão de sangue representa um veículo ideal para a aquisição de infeções. O volume de sangue colhido a partir do dador pode conter contaminação bacteriana, principalmente por bactérias do intestino, de infeções pré-sintomáticas ou por bactérias exógenas, nomeadamente da pele, mas também por vírus e parasitas. (8)

#### **Risco de Transmissão Microbiológica por Transfusão Sanguínea**

O risco de transmissão de patologias infecciosas a partir de transfusão sanguínea é muito baixo, contudo não é inexistente.

Segundo o Relatório de Atividade dos Serviços de Sangue e Medicina Transfusional de 2012, publicados pelo Instituto Português de Sangue e Transplantação, IP (IPST, IP)(12) e embora a entrevista oral aos doadores não tenha a mesma sensibilidade que os testes analíticos efetuados na amostra, (Tabela 2), é um mecanismo importante de triagem para a eliminação de doadores potencialmente infetados, como se pode verificar pela tabela a seguir apresentada.



**Tabela 1: Número de dádivas homólogas recusadas (após entrevista médica) (20)**

Número de dádivas homólogas recusadas (após entrevista médica)	
	Nº de dádivas recusadas
Baixos níveis de hemoglobina	22408
Comportamentos de alto risco	2078
Viagens	2475
Síndrome Gripal	4714
Auto-exclusão	234
Outros	66006
Total de dádivas recusadas	97915

De entre as unidades descartadas por componentes, ou seja, com resultado positivo para a presença de microrganismos (Tabela 2). Destaca-se a diferença numérica entre os componentes obtidos por fracionamento de sangue total e os obtidos por aférese. Estes últimos apresentando um valor de recusa mais baixo.

**Tabela 2: Número de unidades inutilizadas dos diferentes componentes sanguíneos produzidos. (20)**

Número de unidades inutilizadas dos diferentes componentes sanguíneos produzidos				
	Eritrócitos	Plaquetas (Pool e Aférese)	Plaquetas (Sangue Total)	Plasma
Análise positiva para doenças infecciosas	3398	56	810	1566

Os resultados do painel analítico implementado (Tabelas 3,4,5 e 6) mostram a importância das técnicas serológicas numa fase de *screening*, para deteção de microrganismos patogénicos e das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos para confirmação. Estes resultados demonstram a robustez atual destas técnicas, no que se refere à sua especificidade e sensibilidade.

**Tabela 3: Análise de doenças infecciosas: Hepatite B; C e HIV. (20)**

	N.º de dadores de primeira vez			N.º de dadores habituais			N.º de potenciais dadores		
	ELISA + TAN -	ELISA + TAN +	ELISA - TAN +	ELISA + TAN -	ELISA + TAN +	ELISA - TAN +	ELISA+ TAN -	ELISA+ TAN +	ELISA - TAN +
Antigénio Hbs	13	46	2	51	5	2	0	0	0
Anti VHC	58	29	0	206	2	1	0	0	0
Anti HIV	22	17	1	69	14	1	0	0	0

**Tabela 4: Resultados dos testes serológicos para a Sífilis. (20)**

Sífilis	N.º de dadores de primeira vez	N.º de dadores habituais	N.º de potenciais dadores
IgM positivo e IgG negativo	6	7	0
IgM positivo e IgG positivo	8	15	0
IgM negativo e IgG positivo	14/	452	0
IgM e IgG positivo (não desciminado)	139	556	0

**Tabela 5: Número de dadores positivos para HTLV I e II. (20)**

HTLV I e HTLV II	n.º de dadores testados	n.º de análises efetuadas	n.º de dadores positivos
	71969	74103	42

**Tabela 6: Número de casos positivos para HIV. (20)**

Agente	Idade	Feminino	Masculino
VIH	Entre 18 e 24 anos	0	5
	Entre 25 e 44 anos	5	20
	Entre 45 e 65 anos	3	3

Embora o processo implementado atualmente na medicina Transfusional apresente elevados valores de segurança é necessário o desenvolvimento de metodologias técnicas a aplicar no processo de desinfeção de sangue total, seus componentes e hemoderivados de forma a garantir uma total segurança em relação à transmissão de patologias infecciosas.

### Hemovigilância

O sistema de Hemovigilância é um sistema de avaliação e alerta, que recolhe todas as informações relacionadas com os efeitos indesejáveis e/ou inesperados da utilização de hemocomponentes, com o objetivo de prevenir o seu aparecimento ou recorrência.(4) A Hemovigilância dá assim um importante contributo para a melhoria da qualidade do processo, permitindo a rastreabilidade e a notificação das ocorrências aos comités de transfusão. (1)

As diretivas da UE obrigam os hospitais a responsabilizar-se pela introdução de um sistema de controlo da qualidade ao longo da cadeia transfusional. Aos serviços de sangue, é exigida a manutenção de sistemas de gestão da qualidade que devem obrigatoriamente ser submetidos a inspeções regulares. (1) A submissão de um relatório anual é obrigatória assim como a notificação de eventos adversos e a capacidade de rastrear cada componente sanguíneo do recetor ao dador. (1)

Desta forma, na UE alguns aspetos da hemovigilância são requisitos legais estabelecidos por diretivas, que mais não passam de um conjunto de procedimentos organizados de vigilância relacionados com eventos ou reações adversas graves ou inesperadas em dadores ou recetores. (1)

O uso clínico do sangue, assim como dos seus componentes, não é da competência da UE, mas da responsabilidade dos diversos estados membros.(1) Em Portugal a legislação em vigor consta no Decreto-Lei n.º 267/2007 de 24 de julho.(13)

As principais instituições de acreditação nesta matéria são a *Joint Commission*, nos Estados Unidos, e a *Care Quality Commission* no Reino Unido. A exigência de novos requisitos de qualidade assim como o desenvolvimento constante de novas técnicas teve

como consequência, não só o aumento da qualidade e segurança do serviço, mas também do custo por unidade. (1)

### Tratamentos Convencionais

Até agora os tratamentos convencionais (Tabela 7), usados para a inativação de microrganismos patogênicos em sangue e seus derivados foram principalmente desenvolvidos contra os contaminantes virais.(3)

Para frações do plasma, os tratamentos usando o calor, como por exemplo pasteurização, não são eficazes para todos os tipos de vírus apresentando riscos de danos nas proteínas.(14) A irradiação dos componentes usando luz ultravioleta (UV) é outro dos métodos utilizados mas observam-se danos nos componentes do plasma. O tratamento por UV inativa os vírus através da excitação eletrônica e subseqüentes reações nos pares de bases dos nucleótidos. Contudo, pode também levar à formação de radicais livres prejudiciais às proteínas plasmáticas. (3)

Outro processo utilizado na purificação do sangue e, particularmente importante no Reino Unido, é a nanofiltração, embora este processo possa ser problemático na remoção de partículas mais pequenas na presença de proteínas de elevado peso molecular. Técnicas cromatográficas usando anticorpos específicos adsorvidos é uma outra alternativa, porém não pode ser aplicada a concentrados de plaquetas e eritrócitos dado que as membranas celulares podem ligar-se inespecificamente aos anticorpos adsorvidos na superfície do material de suporte.(3)

Atualmente, o método mais eficaz para a inativação de microrganismos no plasma ou concentrados de proteínas é a utilização combinada de uma mistura de solvente e detergente constituído por tributil-fosfato e Tween 80. No entanto, esta mistura tem de ser removida após o tratamento de inativação, uma vez que é prejudicial para as membranas dos eritrócitos e das plaquetas. (3, 14, 15)

Como referido anteriormente, as diferenças na matriz que constitui os diferentes componentes, torna a escolha do processo de esterilização a adotar complexo. Os métodos

físicos, como a filtração ou a lavagem das células, podem auxiliar na remoção de agentes patogênicos extracelulares mas não surtem qualquer efeito para os que se localizam no interior das células. (3)

Os processos que reduzem a carga microbiológica nos componentes sanguíneos oferecem um nível adicional de segurança contra a transmissão de infecções, incluindo para aquelas em que não existem testes de rastreio. (1)

**Tabela 7: Métodos convencionais para a redução da carga microbiana nos três principais componentes sanguíneos. (10)**

<b>Componente</b>	<b>Métodos/compostos usados para redução da carga microbiológica</b>
<b>Plasma</b>	Tratamento com solvente/detergente (tributil-fosfato/Tween 80).
<b>Plaquetas</b>	Irradiação com UV; realização de culturas bacterianas.
<b>Hemácias</b>	Não há ainda estudos completos sobre o processo de redução microbiana – método convencional (radiação gama)

#### **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Esterilização de Sangue e seus Componentes**

Dada a importância e as limitações no fornecimento de sangue em diversos países do mundo, os procedimentos amplamente aplicáveis para detecção dos microrganismos patogênicos (vírus, bactérias, protozoários, entre outros) no sangue e seus produtos são agora obrigatórios.(16) Os tratamentos convencionais aplicados para a eliminação de microrganismos, como por exemplo a radiação gama, têm como consequência a indução de danos nos componentes celulares do sangue, sendo por este motivo necessário procurar

abordagens mais específicas e menos nefastas.(3) Neste sentido, têm surgido inúmeras alternativas entre as quais a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). (3, 16, 17)

A importância econômica do sangue e o surgimento do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (provocada pelo vírus HIV) levou à introdução de uma regulamentação mais exigente e a aplicação de técnicas de rastreio mais eficazes para a detecção de agentes patogênicos nas doações de sangue. Contudo, devido aos períodos janela (intervalo de tempo entre um doador portador de uma patologia infecciosa e a capacidade de detecção do patogênico na amostra de sangue), a capacidade de encontrar sistemas de desinfecção do sangue e dos seus derivados (plasma, eritrócitos e plaquetas) eficientes tem assumido uma elevada importância. (3, 10, 11)

A seletividade dos processos de esterilização propostos deve ser semelhante à seletividade necessária para a quimioterapia antimicrobiana padrão, contudo o vasto leque de microrganismos existentes no sangue torna difícil este processo. (3)

O sangue é atualmente, um produto comercial à semelhança do que acontece com os produtos farmacêuticos. Por isso, embora todos os países necessitem de sangue e dos seus componentes, as preocupações monetárias e a localização geográfica são fatores determinantes para se ter ou não, acesso a esta terapêutica. Em alguns países este negócio vai para além do pagamento das unidades terapêuticas e envolve também o pagamento dos doadores. Este último fator é responsável por atrair doadores provenientes de classes sociais mais desfavorecidas (pobres e desnutridos, toxicodependentes, entre outros), que são estatisticamente mais propensos a serem portadores e a transmitirem patologias infecciosas relevantes. (3)

Atualmente, todas as doações de sangue são sujeitas a testes *screening* para patogênicos conhecidos, com recurso a técnicas analíticas fiáveis, embora também a este nível o painel analítico adaptado por cada país possa ser também afetado pelas suas condições monetárias. Desta forma, um doador inadvertidamente infetado e assintomático no momento da entrevista e na impossibilidade de as técnicas analíticas detetarem o patogênico, é um potencial transmissor de patologias infecciosas. As unidades terapêuticas resultantes da conjugação de frações de sangue de múltiplos doadores, com vista a aumentar o rendimento do produto é também um importante fator que tem como consequência o aumento das

taxas de infecção. Existe, contudo sempre a possibilidade de introdução na cadeia processual de sangue de um novo agente patogénico “emergente” para o qual não existem ainda testes de rastreio disponíveis no mercado. (3) Apesar de todos estes riscos as taxas de infecção em recetores após transfusão são felizmente muito baixas.(3)

### **Novas abordagens de Desinfecção**

A preocupação com o risco de transmissão de patologias infecciosas que se iniciou com a pandemia do HIV, fez com que as principais indústrias de sangue realizassem investimentos significativos no desenvolvimento de novos métodos de desinfecção com vista à erradicação de microrganismos em sangue e seus hemocomponentes.

O desenvolvimento de técnicas quimioterapêuticas contra microrganismos patogénicos na presença de células de mamífero é prática corrente na indústria farmacêutica. O problema que se coloca no processo de esterilização de sangue é o desenvolvimento de um agente de largo espectro de ação, isto é, capaz de inativar todos os tipos de microrganismos e que seja verdadeiramente efetivo independentemente do local onde este se encontra.(3) Outro fator importante, a ter em conta quando se equaciona o uso de antibióticos padrão é o fenómeno de desenvolvimento de estirpes bacterianas multiressistentes. O desenvolvimento de alergias provocadas por exposição aos antibióticos constitui também um grave problema, uma vez que se trata de material para posterior transfusão. (3)

### **Terapia Fotodinâmica (PDT)**

Os efeitos fotodinâmicos em células vivas são provavelmente tão antigos como a origem da vida. A primeira descrição científica do efeito foi publicada por von Tappeiner e Raab em 1900.(18) Embora as propriedades terapêuticas da luz sejam já conhecidas desde o início levou quase um século de pesquisas científicas até que o primeiro fotossensibilizador recebesse aprovação para a sua utilização em terapia fotodinâmica oncológica em 1995, criando o conceito atual de terapia fotodinâmica. (18, 19)

As possibilidades para a utilização desta terapia foram exploradas a partir da década de 1940, nos EUA. Contudo, foi no início dos anos setenta que as investigações nesta tecnologia ganharam novo fôlego, grande parte devido ao grande desenvolvimento dos

sistemas laser e de fibra ótica. (18) Desde essa altura numerosos fotossensibilizadores têm sido testados. (18)

A terapia fotodinâmica constitui atualmente uma das opções terapêuticas mais promissoras, nomeadamente no campo da Oncologia. Embora o número de artigos publicados seja bastante significativo, estamos ainda longe de uma completa compreensão acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na morte celular induzida por este tipo de terapêutica. (20, 21)

A PDT envolve, a ação combinada de um fotossensibilizador (molécula fotoativada, como por exemplo, as porfirinas), luz e oxigénio molecular. (21-23)

O fotossensibilizador pode ser administrado tópica ou sistemicamente por via oral ou intravenosa. A molécula de fotossensibilizador uma vez iluminada com luz de um comprimento de onda adequado é ativada, levando à geração de espécies reativas de oxigénio (ROS), como seja o oxigénio singleto ( $O^1_2$ ) e radicais livres, tais como anião superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxilo ( $OH^*$ ) capazes de induzir danos oxidativos nas células alvo. (22, 24) Estes ROS causam danos oxidativos nas células microbianas e células malignas. (24, 25) De facto os ROS podem reagir com diferentes biomoléculas, causando alterações em diversas estruturas celulares e vias bioquímicas. (23, 24, 26)

A terapia fotodinâmica tem sido amplamente aplicada, no tratamento de doenças oncológicas, tais como carcinomas da pele, cabeça e pescoço, cérebro, pulmão, bexiga e gastrointestinais. (19, 22, 23, 27) A PDT utilizada no tratamento de patologias oncológicas envolve mecanismos que lesam as membranas das mitocôndrias, lisossomas, núcleos e ativam sinais de apoptose, necrose e autofágicos, que culminam com a morte celular. (23, 24) Este tipo de terapia é capaz de alterar o microambiente do tumor através da diminuição do aporte de oxigénio nos tecidos, o que explica o efeito anti-angiogénico. (23, 24)

A morte celular é tanto mais eficiente quanto maior a disponibilidade do oxigénio e do fotossensibilizador (quantidades não limitantes). Se um destes fatores for limitante a maior parte das células não é imediatamente submetida à apoptose ou necrose. Contudo, o seu crescimento/desenvolvimento pode ser interrompido. (28)



A terapia fotodinâmica oferece diferentes vantagens sobre os tratamentos oncológicos convencionais, de entre os quais se destacam:

- Reduzida toxicidade sistêmica;
- Elevada seletividade para as células tumorais;
- Poucos efeitos secundários;
- Possibilidade de realização de ciclos repetitivos de tratamento e combinação com outras terapias (quimioterapia e radioterapia) (24)

### **Aplicação Clínica do Processo Fotodinâmico**

A terapia fotodinâmica (PDT) assim como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) baseiam-se na utilização da capacidade de os fotossensibilizadores, quando combinados com luz, produzirem oxigénio molecular nefasto para as células. A PDT é usada clinicamente em várias neoplasias e em condições não neoplásicas. Por exemplo, o porfímero de sódio (Photofrin<sup>®</sup>) é atualmente usado mundialmente para o tratamento de cancro do pulmão e no cancro com obstrução esofágica. O ácido 5-aminolevulínico (Levulan<sup>®</sup>) e o seu éster metílico (Metvix<sup>®</sup>) está licenciado nos EUA e Europa, respetivamente, para o tratamento de cancro da pele e o verteporfín (Visudyne<sup>®</sup>) é usado em todo mundo para o tratamento da degeneração macular da retina relacionada com a idade. (9)

Apesar do Photofrin<sup>®</sup> ter sido a primeira droga aprovada para uso em PDT trata-se de uma mistura de composição complexa constituída por uma fração oligomérica de porfirinas. Esta formulação embora amplamente utilizada e eficaz apresenta várias desvantagens, entre as quais se destacam:

- Tendência para causar fotossensibilidade cutânea prolongada;
- Apresenta bandas de absorção a comprimentos de onda menores do que os necessários para que ocorra uma melhor penetração da luz através do tecido;
- Apresenta uma farmacocinética complexa.

Estas limitações incentivaram o desenvolvimento de moléculas fotossensibilizadoras de segunda geração. Estas na sua grande maioria são moléculas do tipo porfirínico, tais como sejam derivados benzoporfirínicos; clorinas; texafirinas, ftalocianinas, naftalocianinas e/ou metabolitos fotossensíveis gerados endogenamente, tais como a protoporfirina-IX. Contudo, existem outros fotossensibilizadores que apresentam outras estruturas químicas distintas das porfirinas, como por exemplo, hipericina; rodamina; azul de metileno e derivados análogos mas que são igualmente capazes de gerar ROS (28)

### Mecanismos de ação da PDT

O principal papel da PDT consiste na morte das células por duas vias possíveis, direta e indireta. O equilíbrio entre estas duas vias é controlado por inúmeros parâmetros, sendo os mais importantes a localização intracelular do fármaco; a sua capacidade de alcançar o local de ação; as propriedades físico-químicas do fotossensibilizador; a concentração de oxigénio e a irradiância. Quando um destes fatores (luz, concentração de fotossensibilizador ou de oxigénio) se encontra em baixas concentrações, torna-se difícil a deteção dos processos de necrose e apoptose. (28)

A morte mediada por luz tem sido amplamente investigada, verificando-se que uma ampla gama de microrganismos se mostra suscetível *in vitro*. Comprova-se ainda que as estirpes multirresistentes apresentam uma suscetibilidade comparável com as suas homólogas não resistentes. Ambos os vírus com invólucro e sem invólucro demonstram ser suscetíveis a PDT assim como os fungos e os protozoários. (9, 29)

A terapia fotodinâmica antimicrobiana, aplica-se ao tratamento localizado da infeção e só será útil se for tolerada pelo paciente. Neste sentido, tem sido demonstrado que os fibroblastos e os queratinócitos podem sobreviver a condições de PDT que são letais para os microrganismos. Estas diferenças de comportamento baseiam-se nas diferenças em relação ao tamanho das células e à sua estrutura. As células humanas são entre 25 a 50 vezes maiores que as células bacterianas e portanto, necessitam de mais danos para induzir a sua morte. As primeiras possuem ainda uma membrana nuclear que confere uma barreira adicional de proteção. A baixa toxicidade em células humanas quando expostas a PDT

indica que esta possui potencial de utilização *in vivo* nas dosagens usadas para inativar microrganismos. (9)

Para que a haja ampla aplicação da PDT no uso clínico é necessário primeiramente assegurar que existem métodos eficazes para que cheguem ao local da infecção, quer o fotossensibilizador quer a luz. Dada a limitada penetração da luz nos tecidos, a utilização da PDT está limitada às áreas do corpo em que a luz a pode alcançar com relativa facilidade, tal como a pele e as cavidades corporais. Se em PDT de tumores, o fotossensibilizador ou o seu precursor, é normalmente administrado por via oral ou intravenosa. Em contrapartida, a administração de fotossensibilizadores para o tratamento de infecções em feridas deve ser aplicada topicamente. (20)

#### Fotossensibilizadores e Fotoprocesso

O procedimento, aplicado na PDT, requer a exposição das células ou tecidos ao fotossensibilizador, seguida da irradiação com luz no comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do composto. Após a absorção da luz, o fotossensibilizador passa para o estado excitado e que podendo sofrer conversão inter-sistemas pode resultar num estado excitado tripleto. Uma vez neste estado, o fotossensibilizador pode participar em reações de oxidação-redução por transferência de eletrões (aceitação ou doação) com uma molécula vizinha (Processo Fotoquímico denominado de Tipo I), originando compostos intermediários radiculares que podem posteriormente reagir com o oxigénio e gerar várias espécies reativas de oxigénio (como seja o anião radical superóxido; peróxido de hidrogénio ou radicais hidroxilo), ou em alternativa, o PS no estado tripleto pode transferir energia para o oxigénio molecular (Processo Fotoquímico denominado de Tipo II), gerando desta forma oxigénio singleto, uma forma altamente oxidante de oxigénio que reage com muitas moléculas biológicas incluindo lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. (15, 18, 20, 28)

Após a transferência de energia o PS regressa ao estado fundamental, pode novamente ser excitado por absorção de mais fotões funcionando como um processo fotocatalítico ou

degradar-se quimicamente, processo designado por fotodegradação. O PS pode ainda reagir diretamente com as biomoléculas e formar aductos. (20)

Os PS mais estudados em PDT de tumores são as porfirinas, uma vez que apresentam baixos níveis de toxicidade e poucas interações farmacológicas com outras drogas, fazendo da PDT um procedimento seguro e passível de combinação com outros tipos de tratamentos convencionais.(20, 22), (30), (31)

Os efeitos da terapia fotodinâmica nos eritrócitos pode ser observada naturalmente em pacientes com protoporfiria eritropoética (EPP). A exposição a pequenas irradiâncias, tal como obtido pela passagem dos eritrócitos pelos capilares da pele, leva à transferência de protoporfirina IX para as células endoteliais. Durante a terapia fotodinâmica *in vivo* os eritrócitos são também fotossensibilizados. Este processo tem como consequência o aumento dos valores de bilirrubina séricos. Pelos motivos já apresentados os eritrócitos são importantes modelos de estudo na pesquisa experimental relativa aos efeitos fototóxicos da terapia fotodinâmica. Os efeitos sobre os eritrócitos devem ser evitados através da escolha de um fotossensibilizador seletivo fotoativado com luz com baixa irradiância e tratamento combinado com agentes antioxidantes como o dipiramole. (18)

Os eritrócitos são um elemento importante a ter em conta nesta terapia, nomeadamente no estudo celular e molecular dos princípios associados à PDT. De entre as suas principais características, destacam-se:

- O sangue é responsável por exercer o transporte do fotossensibilizador para os tecidos;
- A geração de ROS (nomeadamente o oxigénio singlete) é um fator importante para uma eficiente aPDT. Por este motivo, os eritrócitos como responsáveis pelo sistema de transporte de oxigénio no corpo, constituem-se como uma relevância extrema. As diferenças nos espectros da oxi-hemoglobina e da desoxi-hemoglobina podem ser utilizados para a monitorização da oxigenação do tecido sob tratamento;
- O sangue é ainda utilizado para controlar a distribuição do fotossensibilizador, uma vez que, após aplicação tópica dos fotossensibilizadores a profundidade de penetração dos mesmos e a sua bioacumulação em determinados tecidos pode ser

calculada a partir dos espectros de fluorescência e da medição da velocidade com que os compostos atingem a corrente sanguínea. A cromatografia líquida é um bom método para determinar a concentração de fotossensibilizador na corrente sanguínea. (18)

### Eritrócitos como modelos experimentais em PDT

Os eritrócitos são modelos experimentais populares, uma vez que são de fácil obtenção em grande número, sem que a sua colheita apresente consequências para a saúde de doadores saudáveis.

Relativamente à ação dos fotossensibilizadores nos eritrócitos estes podem ser usados como modelos de células intactas ou como eritrócitos fantasma, isto é, após extração da hemoglobina de modo a que permaneça apenas a membrana celular e o citoesqueleto.(18) A emissão prolongada de fluorescência após exposição ao fotossensibilizador demonstra que estes se acumulam nas membranas dos eritrócitos.(18) Outra aplicação dos eritrócitos como modelos de membrana está relacionada com a geração de oxigénio singlete. A geração de oxigénio singlete é conhecida desde 1960. Mais tarde foi demonstrado que também ocorre nos eritrócitos. Oelckers et al, foi capaz de detetar oxigénio singlete no interior da membrana dos eritrócitos. (18, 32)Esta foi a primeira demonstração da existência de luminescência proveniente do oxigénio no interior de membranas celulares. Os danos fotodinâmicos na membrana dos eritrócitos começam com a libertação de potássio. A hemólise apenas indica a rutura da membrana celular. (18, 32)

Ball et al, verificou que a libertação de potássio e a libertação de hemoglobina se encontram relacionadas.(18, 33) Isto indica que os processos estão causalmente ligados. De acordo com a prática comum em ensaios de cultura celular, em que a morte das células é monitorizada pela rotura da membrana (coloração e contagem de células vivas ou mortas) a hemólise nos eritrócitos pode ser considerada como uma medição da morte destas células. Medições espectroscópicas da hemoglobina são muito mais fáceis e mais rápidas de executar do que a técnica de coloração e contagem. Esta é uma outra vantagem da utilização dos eritrócitos. Os mecanismos inerentes à libertação de potássio acima indicado

são desconhecidos. No entanto, é proposto um mecanismo relacionado com a operação de um canal catiónico não seletivo existente na membrana dos eritrócitos. Este canal é ativado pelo *stress* oxidativo de modo que a geração de oxigénio singlete altamente reativo desencadeia o transporte através deste canal. O canal é permeável ao cálcio. Assim, a atuação conjunta de um canal não seletivo e o canal de Gardos poderia ser responsável pela libertação de potássio, como proposto por Kaestner e Bernhardt.(18) O canal de Gardos permite compreender a libertação de potássio que é vista após PDT dos eritrócitos. Além disso, a entrada de cálcio nos eritrócitos levaria a alterações na membrana fosfolipídica e levaria a uma interrupção da distribuição dos fosfolípidos. Este processo pode ser uma razão para a observação de agregação eritrocitária após PDT. Além disso, a ativação dos canais catiónicos não seletivos leva ao influxo de sódio e portanto provoca a turgescência dos eritrócitos. Este aumento de volume celular em associação com a alteração da estabilidade da membrana devido à quebra de assimetria da bicamada fosfolipídica pode ser a causa da hemólise dos eritrócitos. (18)

Os danos da terapia fotodinâmica nos eritrócitos foram relatados após a utilização terapêutica de photofrin II em cérebro de gatos, onde se verificou a formação de agregados eritrocitários que em muitas situações preenchiam totalmente o lúmen dos vasos. Além do fenómeno de agregação eritrocitária observou-se ainda evidências de hemólise intravascular. Este processo demonstra que os eritrócitos podem ser parte de um mecanismo de indução de necrose do tumor através do bloqueio da vasculatura devido à sua agregação ou devido as fotodanos as células endoteliais produzam fatores de coagulação que levam à formação destes agregados. A ligação de fotossensibilizadores a dispositivos químicos (ex. anticorpos) aumentam a sua especificidade biológica para que este se ligue especificamente a um tipo de célula definido. Por este motivo, os fotodanos nos eritrócitos podem ser evitados ou pelo menos reduzidos. (18)

#### Ftalocianinas e Porfirinas na inativação microbiana em sangue

Embora as ftalocianinas possam ser consideradas compostos análogos às porfirinas, possuem um maior carácter aromático, o que lhes permite absorver mais intensamente próximo da região do infravermelho.(3) Para além deste fator, é importante referir que a

sua síntese é relativamente mais simples, quando comparada com as porfirinas, sendo estes derivados obtidos com muito bons rendimentos. (3)

Como fotossensibilizadores as ftalocianinas apresentam um elevado rendimento quântico de produção de oxigénio singlete, maior que os fotossensibilizadores usados no tratamento de sangue como seja, o MB. (3)

Dadas as suas características e propriedades fotofísicas, as ftalocianinas apresentam-se como uma classe de fotossensibilizadores muito interessante para a aplicação e desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica. (3)

As ftalocianinas têm mostrado algum potencial na área de desinfeção de sangue, embora ao contrário do MB, ainda não tenham chegado ao mercado.(3) Apesar disso, tem-se verificado que esta classe de fotossensibilizadores tem-se apresentado muito eficaz no processo de fotoinativação de vírus em vários hemocomponentes.(3) Os vírus encapsulados como o HIV são geralmente sensíveis à sua fotoinativação.(3) Infelizmente, ainda existem poucos trabalhos desenvolvidos sobre os efeitos bactericidas desta classe de compostos, na presença de componentes sanguíneos.(3)

#### Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A aplicação da terapia fotodinâmica para esterilização de sangue e seus componentes é já uma realidade. Em Portugal, a terapia fotodinâmica está ser aplicada desde o final de 2014. Assim, desde esse período que o IPST tem disponível plasma inativado por dois métodos distintos (método do solvente detergente e através do amotosaleno, também referido como Intercept<sup>®</sup>). De entre os vários fotossensibilizadores usados destacam-se:

#### Azul-de-metileno (MB)

O azul-de-metileno é um corante de tipo fenotiazínico carregado positivamente com uma elevada afinidade para componentes carregados negativamente (Figura 1).(10, 15) Quando o MB é ativado por luz visível, ocorre uma reação fotodinâmica que gera ROS, e que ataca particularmente a guanina, sendo por isso, responsável por danos nos ácidos nucleicos. O

tratamento fotodinâmico usando MB é eficaz no processo de redução de agentes patogênicos, nomeadamente de alguns vírus sem e com envólucro. Devido à fraca penetração do MB através das membranas plasmáticas, o MB não consegue inativar agentes patogênicos intracelulares e danificar leucócitos. Contudo, a sua ligação às proteínas do plasma faz com que a sua actividade fotodinâmica diminua, impedindo uma eficaz redução microbiana no sangue. (8, 9, 15, 34)

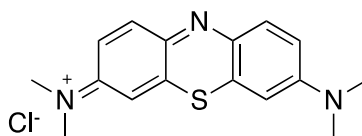


Figura 1: Estrutura do azul-de-metileno.

As metodologias que recorrem ao MB necessitam, numa primeira fase de leucoredução através de membranas de filtração. De seguida é adicionado ao plasma MB à concentração plasmática de 1 M. O plasma é posteriormente irradiado com luz de comprimento de onda de 590 nm (luz vermelha) recebendo uma dose de energia total de 180 J/cm<sup>2</sup>. De seguida o plasma contendo MB é filtrado através de um filtro BlueFlex<sup>®</sup>, de forma o MB. Como este componente do sangue não apresenta quaisquer elementos celulares o MB ligar-se-á aos ácidos nucleicos dos elementos celulares contaminantes, contribuindo desta forma, para a esterilização do plasma. (5, 9)

## Psoralenos

As furocoumarinas, do qual faz parte o psoraleno (Figura 2), são compostos fotoativos isolados de plantas e que são conhecidos desde os tempos antigos. (10, 15) O cloridrato de amotosaleno (também conhecido como S-59 ou 3-[(2-aminoetoxi)metil]-2,5,9-trimetil-7H-furo[3,2-g][1]benzopirran-7-ona) foi especialmente selecionado para redução da carga microbiana em produtos do sangue, uma vez que atravessa as membranas plasmáticas de forma eficiente, mostrando uma excelente proteção contra os agentes patogênicos. Dado que o S-59 é ativado por radiação ultravioleta (UV entre 320-400 nm) e que parte da luz é absorvida pela hemoglobina, o S-59 não pode ser aplicado na esterilização dos concentrados de hemácias. (8, 34, 35)



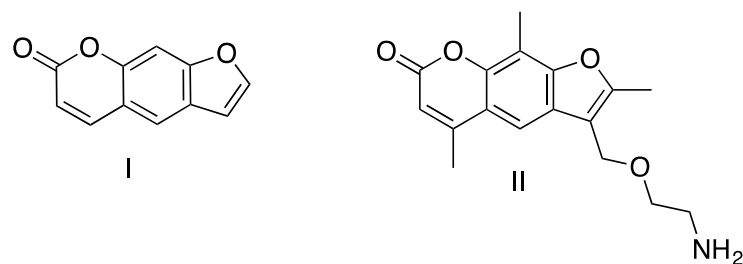


Figura 2: Estrutura geral dos psoralenos (I) e do amotosaleno (II)

O S-59 tem como alvo a região helicoidal do DNA de cadeia simples ou dupla, ou de RNA, e intercala-se quase sempre imediatamente após a adição. Após a exposição a luz UV o S-59 estabelece uma ligação covalente à pirimidina, e com a exposição continuada a radiação UV cria ligações cruzadas entre as estruturas de cadeia dupla, enquanto as estruturas de cadeia simples são reticuladas em loops. O S-59 fotodegrada-se em moléculas bem conhecidas e que são rapidamente excretadas. Além de lesar os ácidos nucleicos o S-59 também se liga a lípidos e proteínas. Assim, cerca de 15% do S-59 inicialmente adicionado permanece no plasma e nas plaquetas, mesmo após processos de remoção do S-59 e dos seus fotoprodutos. A maioria está associada aos lípidos, mas 1-2% está associado a proteínas. (8, 34)

O tratamento com S59 tem sido eficaz no processo de inativação de um largo espectro de vírus com invólucro, bactérias e protozoários. O seu efeito é, contudo mais inconstante sobre os vírus sem invólucro. O tratamento com psoraleno também afeta os leucócitos residuais. (8, 34)

O Intercept<sup>®</sup> é um sistema de tratamento de sangue, mais concretamente para plasma, com vista à inativação de microrganismos patogénicos, nomeadamente, bactérias, vírus, parasitas mas também leucócitos. O dispositivo utiliza um derivado do amotosaleno S-59 contendo um hidrato de carbono como composto fotoativo e luz UV. O plasma a tratar é previamente colhido por aférese a partir de sangue total com uma quantidade  $<4 \times 10^6$  células/mL, incluindo o anticoagulante e antes da adição de amotosaleno. O sangue passa do recipiente de plástico onde é recolhido para um outro recipiente contendo o amotosaleno e deste para o recipiente que será sujeito a iluminação UV. Antes da

iluminação a concentração de amotosaleno no plasma é de 150  $\mu\text{M}$ . O iluminador Intercept® ilumina a amostra. Este está ligado a um dispositivo auxiliar controlado por um microprocessador desenhado para administrar a dose de luz pretendida de 3  $\text{J}/\text{cm}^2$ . O equipamento inclui ainda um dispositivo de adsorção de compostos que reduz consideravelmente o nível de amotosaleno residual e respetivos fotoprodutos no plasma antes do seu armazenamento. (15, 36)

### Riboflavina

Apesar de fototóxica para os ácidos nucleicos, a vitamina B<sub>2</sub>, riboflavina (RF) (Figura 3) é geralmente reconhecida como sendo uma substância inócua e segura. Este facto é suportado pela segurança que oferece a sua utilização em situações de fototerapia de icterícia neonatal. A riboflavina e os seus fotoprodutos estão presentes em diversos alimentos e em produtos naturais usualmente consumidos, sendo RF e seus catabolitos e fotoprodutos detetáveis no sangue em indivíduos saudáveis. Isto sugere que a sua presença no sangue pode ser ubíqua. No entanto, a sua segurança efetiva necessita ainda de maior investigação uma vez que o nível de fotoprodutos de RF é substancialmente superior, em componentes do sangue tratados com este fotossensibilizador. (8, 34)

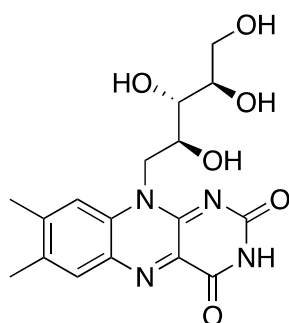


Figura 3: Estrutura da Riboflavina Vitamina B2

A RF provou ser eficaz contra uma vasta gama de patogénicos, incluindo bactérias, vírus com invólucro e alguns vírus sem invólucro, protozoários e também afeta os leucócitos. (8, 34)

## Fonte de Luz

Para uso clínico nomeadamente em oncobiologia, o PS deverá ser fotoativado com luz de comprimento de onda entre os 600 e os 900 nm. Isto porque, os corantes endógenos, principalmente a hemoglobina, absorvem fortemente a luz de comprimentos de onda inferiores a 600 nm e luz com comprimentos de onda superior a 900 nm não é suficientemente energética para produzir oxigénio singleto. (20)

As fontes de luz utilizadas podem ser de vários tipos incluindo, lâmpadas de halogénio, fluorescentes; tungsténio ou lâmpadas de xénon. Contudo, tem sido usada com sucesso luz proveniente de fontes laser, cuja pureza monocromática a distingue das outras e permite controlar de forma eficaz a dose de luz administrada. (20)

## Controlos

Ao longo de todos os ensaios realizados foram, em simultâneo efetuados dois tipos de controlos, controlos claro e escuro. Os controlos permitiram aferir se a redução da carga microbiológica da amostra se devia exclusivamente ao fotossensibilizador testado.

O controlo claro era composto pela matriz a testar (sangue total, plasma ou PBS) e pela suspensão da bactéria enquanto, por sua vez, o controlo escuro era composto pela matriz, pela suspensão da bactéria e pelo fotossensibilizador a testar. O controlo claro foi exposto em simultâneo com a amostra à luz enquanto o controlo escuro se mantinha ao abrigo da luz durante todo o ensaio. Assim, o controlo claro permitiu comprovar que a luz na ausência de fotossensibilizador não tinha atividade microbiana, assim como o controlo escuro permitiu comprovar que na ausência de luz o fotossensibilizador não possuía qualquer atividade.

## Objetivos

Os objetivo central deste trabalho foi o estudo da aplicação da terapia fotodinâmica no processo de esterilização de sangue com derivados de porfirina e ftalocianina. Com vista a este objetivo efetuou-se:

- A avaliação da atividade fotodinâmica de um derivado ftalocianínico e outro profirínico na fotoinativação de bactérias de Gram negativo de *E.coli* em PBS, plasma e sangue total;
- A avaliação do número de células através da realização de contagens celulares antes e após tratamento.

No capítulo 1 é feita uma revisão do estado da arte relativo ao papel do sangue na clínica, ao risco de transmissão de infeções e às técnicas de desinfeção do sangue e seus hemoderivados. No capítulo 2 encontram-se descritos os resultados obtidos ao longo dos diversos ensaios laboratoriais e é feita sua discussão.

No capítulo 3 são apresentadas as principais conclusões do trabalho realizado.

## Capítulo 2: Application of phthalocyanines and porphyrins in blood sterilization

---

Luís Teles<sup>1</sup>, Leandro Lourenço<sup>2</sup>, Ângela Cunha<sup>1</sup>, M. Graça P. M. S. Neves<sup>2</sup>, José A. S. Cavaleiro<sup>2</sup>, João P. C. Tomé<sup>2,3</sup>, M. Amparo F. Faustino<sup>2</sup>, Adelaide Almeida<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology and CESAM; University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal.

<sup>2</sup> Department of Chemistry and QOPNA, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal.

<sup>3</sup> Department of Organic and Macromolecular Chemistry, Ghent University, B-9000 Gent, Belgium.

### Abstract

The therapeutic properties of light have been known for thousands of years, but it was only in the last century that antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) was developed. aPDT involves interaction between light and a chemical dye or photosensitizer in the presence of molecular oxygen. This interaction produces reactive oxygen species (ROS) which cause oxidative damage of microbial vital molecules.

The medical importance of blood combined to the advent of the AIDS epidemic and other infectious diseases led to an improved pathogen screening techniques for donated blood. However, due to the “window” periods where infective agents cannot be detected, the ability to disinfect blood and its derivatives has assumed great importance. Whereas conventional disinfection techniques (solvent-detergent treatment or ultra-violet irradiation) may be employed in plasma or protein concentrates, the collateral damage associated with such treatments disallows their use with cellular fractions.

The aim of this study was to evaluate the suitability of phthalocyanines (Pc) and porphyrins (Por) for the photodynamic disinfection of blood products. Plasma and whole blood were infected with  $10^8$  colony forming units (CFU)/mL of *Escherichia coli* and exposed during 270 min to either red light, for Pcs, or white light, for Por ( $150 \text{ W/m}^2$ ). The concentration of viable *E. coli* was determinate at 0, 30, 60, 90, 180 and 270 min and compared with light (irradiated in the absence of PS) and dark (incubated with PS but non-

irradiated) controls. The effect of the aPDT treatment on blood cells (red and white blood cells) was also evaluated.

The results show that Por are more effective in the inactivation of *E. coli* than Pc, in all components of blood. After treatment, the number of red and white blood cells is similar to the ones of control samples. The effective reduction of *E. coli* and the absence of effect on blood cells demonstrate that it is possible to use Pc and Por for the photodynamic disinfection of blood products.

**Keywords:** antimicrobial photodynamic therapy (aPDT); porphyrins; phthalocyanines; blood products; blood disinfection techniques.

---

## Introduction

Blood is a unique and universal resource. All people of the world are potential users of the blood or blood products.(11) Unfortunately, the blood is a commercial product in the same sense as a pharmaceutical product. Therefore, although every person need blood, the monetary concerns and geographical location are important factors to determine whether or not we can have access to this resource.(3)

Human blood is a life support system containing the cells necessary for oxygen transport, pathogen identification/elimination and wound healing in addition to the proteins and enzymes essential for wound and tissue repair. (3)

The modern separation techniques allow the blood fractionation and consequently, obtaining many useful products either in terms of replacement or of therapeutic products.(3)

In fact, until the 70s it was common to transfusing whole blood. Currently, in USA and EU countries the blood is processed in different products (red blood cells concentrates (RBCC); platelets concentrates (PC) and plasma) and used according the needs. (1)

The typical process of the collect blood to transfusion involves the harvest of 450-500 mL of donor blood to a plastic container containing 63 mL of the preservative and anticoagulant solutions such as Citrate Phosphate Dextrose (CPD) or CPD-adenine. The citrate capture the calcium ion and acts as a blocker of the coagulation cascade; glucose and adenine are responsible for maintaining the metabolism of the red blood cells during storage. (1) The unit of blood is then filtered to complete removal of leukocytes. Most of

the plasma is also removed and added to erythrocytes an additive solution containing glycerol in order to maintain their metabolism during storage. (1) Red blood cell concentrates can be stored at 4-6°C for up to 35 days. (2)

Plasma is the aqueous fraction of the blood and contain the proteins, serum lipoproteins and clotting factors. (2) Plasma is frozen promptly and thawed before use. Fresh frozen plasma (FFP) stored at -18 °C has a shelf life of five years. Infection rates are higher for plasma fractions or products derived from them due to the pooling (combining) of plasma obtained from different donors.(3, 14)

Platelets are concentrated from plasma and can be stored at 22 °C along three days. (6, 7) Platelets are concentrated from multiple donations at least five units of blood is required for obtain one PC unit.(3)

The RBC is used in several clinical conditions such as hypoxia by blood loss after trauma or surgery. (3, 4) The concentration of RBCCs are prepared from a unit of whole blood by removing approximately 130 to 230 ml of plasma having a final volume of 220 - 320 mL. The hematocrit value is between 65-80%. (4) After leukoreduction by filtration, these component is undergon at a dose of 2500 rad by to gamma irradiation.(4) Alternatively, the RBBC can be washed with sterile saline solution that after centrifugation allows to remove significant amounts of cellular debris, potassium, plasma, platelets and leukocytes. (8) After this process, the blood component is called a concentrate of washed red cells and has a shelf life of 24 hours when stored at 2-6 ° C. (4)

All of these blood products have the potential to transmit pathogens and cause disease in donors.(10) Although the ideal would be a treatment that could be applied to all microorganisms types, there are many factors that influence this process. The first adversity arises due to the matrix that constitutes the different components. While the plasma is essentially an aqueous solution where proteins are in suspension; platelets and erythrocytes are of cellular nature. Consequently, an infectious microorganism has considerable physical and morphological differences compared to a plasma protein but can be similar to the cellular components of blood. Furthermore, the location of the pathogen also depends on the blood fraction, i.e. in plasma the microorganisms are in the suspension while in the concentrated platelets and erythrocytes, the microorganisms may be in suspension or associated with cells may be intracellular or extracellular.(3)

Blood is a precious tissue and a scarce resource for many countries with difficulties in meeting the needs of blood and blood components. In the European Union (EU), the availability of these components completely depends on voluntary donor services, so currently there is every interest in demonstrating to donors that each gift is conscientiously and effectively used. (1, 11) The problems associated with decrease of blood provisions is resulted of an aging population and the introduction of new prevention measures, regarding the safety of the recipient. (1) Blood transfusion is an ideal vehicle for acquiring infections. The volume of blood collected from the donor can contain pathogenic agents such viruses, parasites but also bacteria, especially bacteria of the gut or from pre-symptomatic infections or exogenous bacteria, in particular of the skin. (8)

Until now, the conventional treatments used to inactivate pathogenic microorganisms in blood and blood products were developed essentially against viral contaminants. (3)

For plasma fractions the heat treatments, such as pasteurisation, are not effective for all types of viruses and present risks of proteins damage.(14) Irradiation of the components by ultraviolet (UV) light is another method used but it is observed damage in some plasma components. The UV treatment inactivates viruses by electronic excitation and subsequent reactions in nucleotide pair bases. However, it may also lead to the formation of harmful free radicals.(3)

Other processes used in blood purification are nanofiltration or chromatography techniques using specific antibodies adsorbed. However these processes may be problematic to remove smaller particles in the presence of high molecular weight proteins and cannot be applied to concentrated platelets and erythrocytes given that cell membranes can bind non-specifically to the antibodies, respectively.(3, 14)

Currently, the most effective method for inactivating microorganisms in plasma or protein concentrates is the combined use of a solvent tri(*n*-butyl)phosphate and a detergent Tween 80 mixture. However, these mixture have to be removed after treatment because they are harmful to the membranes of erythrocytes and platelets.(3, 14)

The difference in the matrix that constitutes the various components of blood cells makes the sterilization process to adopt complex. Physical methods, such as filtration or washing



the cells, can assist in the removal of extracellular pathogens but fail to have any effect on those located within the cells.(3)

The processes which reduce the microbial count on blood components provide an additional level of security against transmission of infections, including those where there not exist screening test.(1)

The appearing of the HIV infection and high transmission risk pushed the major industries of blood (Baxter, Cerus and Cobe-Gambro) for significant investments in developing new disinfection methods for the eradication of microorganisms in blood and blood components.

The development of chemotherapeutic techniques against pathogenic microorganisms in the presence of mammalian cells is common practice in the pharmaceutical industry but the main problem in blood sterilization process is the development of a compound with large spectrum of action.(3) Another important factor to be taken into account when using antibiotics with large spectrum is the development of bacterial strains multi resistant. The development of allergies caused by exposure to antibiotics is also a serious problem because that it is a material for transfusion.(3)

The application of photodynamic therapy in blood sterilization is a reality due to the use of the approved photosensitizers: methylene blue (MB), psoralen and riboflavin (RB).(15)

The methylene blue is a phenothiazine dye positively charged with a high affinity for negatively charged components. (5, 10, 15) The photodynamic action of the MB affects particularly guanine and therefore is responsible for damage on nucleic acids. The photodynamic treatment using MB is effective in the reduction process of pathogens, including some non-enveloped viruses and enveloped. Due to the poor penetration through cell membranes the MB cannot inactivate intracellular pathogens and damage leukocytes. The ability of MB to binding to plasma proteins affects their microbial activity, preventing by this way an effective microbial reduction in the blood.(8, 9, 34)

The psoralens (furocoumarins) are compounds isolated from plants that are known to be photosensitizers since ancient times.(10, 15) The hydrochloride amotosalen (also known as S-59 and 3-[(2-aminoethoxy)methyl]-2,5,9-trimethyl-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one) has been specially selected to reduce the microbial load in blood products, it passes through plasma membranes efficiently, showing excellent protection against pathogens.

Since the S-59 is activated by light between 320-400 nm and this light can be absorbed by haemoglobin, S-59 cannot be applied to sterilization of packed red blood cells. (8, 34, 35)

Also, although phototoxic to nucleic acids, vitamin B<sub>2</sub>, RF is generally recognized as a safe and harmless substance. This safety is supported by its use in neonatal jaundice phototherapy. The Riboflavin and its photoproducts are present in many foods and natural products of common use, being RF, their catabolites and photoproducts detectable in the blood in healthy individuals. This suggests that their presence in the blood may be ubiquitous. However, the actual safety still needs further investigation since the level of RF photoproducts is substantially higher in blood components phototreated in the presence of RF.(8, 34, 37)

The phthalocyanines were considered analogous compounds to porphyrin but they have a most aromatic character, which allows them to absorb more strongly near infrared region. (3, 21, 38) In addition to this factor, it is important to note that their synthesis is relatively simple, compared with porphyrins, these derivatives being obtained in very good yields. (3)

As photosensitizers phthalocyanines have in general a high yield in singlet oxygen production, higher than the photosensitizers used in the treatment of blood such as the methylene blue. (3)

Given its characteristics and photophysical properties, phthalocyanines feature as a photosensitizer class very interesting for the application and development of photodynamic therapy. (3, 20)

The phthalocyanines have shown some potential in the field of blood disinfection, although unlike blue methylene, have not yet reached the market. (3, 39) However, it has been found that photosensitizers class has become very presented effective in the virus photoinactivation process into various components. (3) Enveloped viruses such as HIV are generally sensitive to its photoinactivation. (3) Unfortunately, little work has been done on the bactericidal effects of different compounds belonging to this class, in presence of blood components. (3)

The aim of this study was to evaluate the suitability of phthalocyanines (**Pc**) and porphyrins (**Por**) for the photodynamic disinfection of blood products.

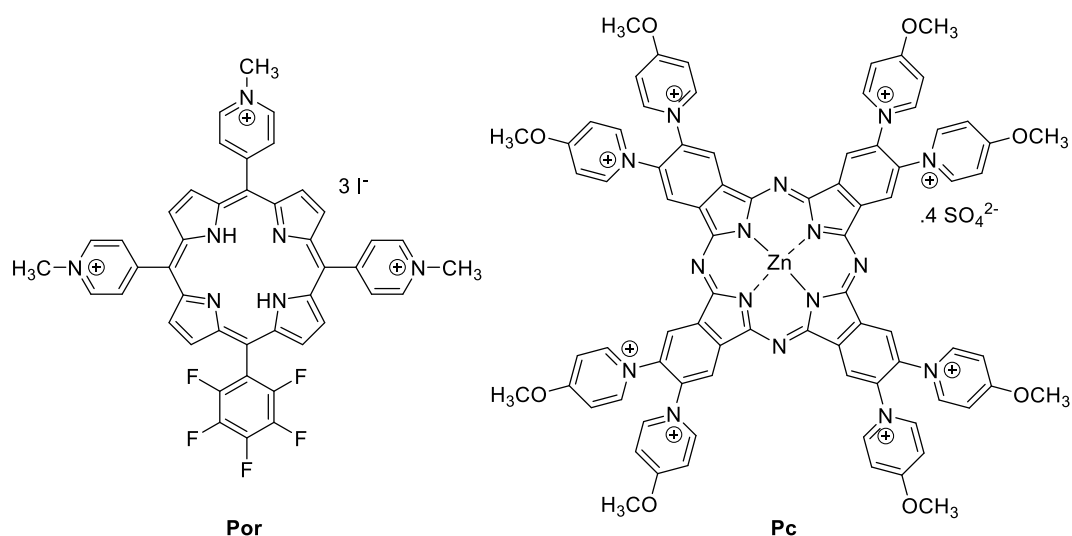


Fig 1. Structures of 2,3,9,10,16,17,23,24-Octakis(4-methoxypyridinium-1-yl) phthalocyaninatozinc(II) (**Pc**) and of 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl)porphyrin (**Por**) used in this study against *E. coli*.

## Material and Methods

### Samples

The samples tested were provided by Avelab clinical laboratory located in Aveiro. The samples consisted of blood test tubes containing whole blood and anticoagulant EDTAk3 with a final volume of 5 mL. The samples were used in the period from up to 5 days after harvest. The whole blood tubes were centrifuged at 3500 rpm for 5 min to obtain the plasma and the erythrocytes. The plasma was then separated from the red blood cells and each fraction was tested individually.

### Microorganism and growth conditions

*E. coli* cells were grown in first on trypticase soy agar (TSA, Merck) plate and were incubated for 24 h at 37°C. Then, one colony of *E.coli* was inoculated on 10 mL of trypticase soy broth (TSB, Merck) for 12 h at 37 °C. After this period, was inoculated 100 µL of the bacterial culture on a new TSB middle for 12 h at 37 °C. After this time, the optical density of culture was measured at 590 nm and used only the cultures with optical density between 0.7-0.8.

### Irradiation conditions

The effect of the 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis(4-methoxypyridinium-1-yl)phthalocyaninatozinc(II) (**Pc**) and of the 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl)porphyrin (**Por**) dissolved in DMSO (of stock solution at 500  $\mu\text{M}$ ) was evaluated by exposing the samples and controls to red light and white light respectively (600-700 nm) delivered by a LUMACARE system with an irradiance of 150  $\text{W m}^{-2}$ , for 270 min, under 100 rpm mechanical stirring. Before the assay, the photosensitizers were put stirring on sonicator for 30 min.

### PDI assays with *E.coli* in PBS, plasma and blood.

Bacterial cultures ( $10^8$  colony forming units (CFU)/mL of *E. coli* in stationary phase) were tenfold diluted in phosphate buffered saline (PBS), plasma or blood, and bacterial suspension was distributed in sterilized glass beakers. The appropriate volume of the photosensitizer **Por** and **Pc**, was added to achieve a final concentration of 5  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  for **Por** and **Pc**, respectively. During the experiments, light and dark controls were also performed: in the light control the beaker without PS was exposed to light; in the dark control the beaker containing 5  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  for **Por** and **Pc**, respectively, was protected from light with aluminium foil during the experiment. During the pre-irradiation period, the samples were incubated for 10 min with stirring, at room temperature, in order to promote the binding of the porphyrin to *E. coli* cells. The samples were exposed to light under stirring.

The efficiency of the **Pc** and of the **Por** derivative was evaluated through quantification of the number of colony forming units (CFU) per volume ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ). A volume of 1.0 mL of test and control samples was collected at time 0 and after pre-defined times (30, 60, 90, 180 and 270 min) of light exposure, then serially diluted and plated in duplicate in TSA medium.

The Petri plates were kept on the dark immediately after plating and during the incubation period. After 24 h of incubation at 37 °C the number of colonies was counted in the most convenient series of dilution. All the experiments were performed using the same experimental conditions.

The number of cells was determined at the end of each test by counting in Neubauer chamber. The cell counts were performed at the end of each testing at time 0 and after 270 min of exposure. At the end of each period was removal a portion of the sample and controls and diluted in PBS at  $10^{-3}$  porporção. Then they were removed 10 uL of dilution and proceeded to the count in a Neubauer chamber in Leica microscope at 10x and 40x. Leukocytes were counted in four squares in far end and the erythrocytes in the five central squares.

The cells were identified by their morphology, size and presence of granules or cell nucleus.

### **Statistical Methods**

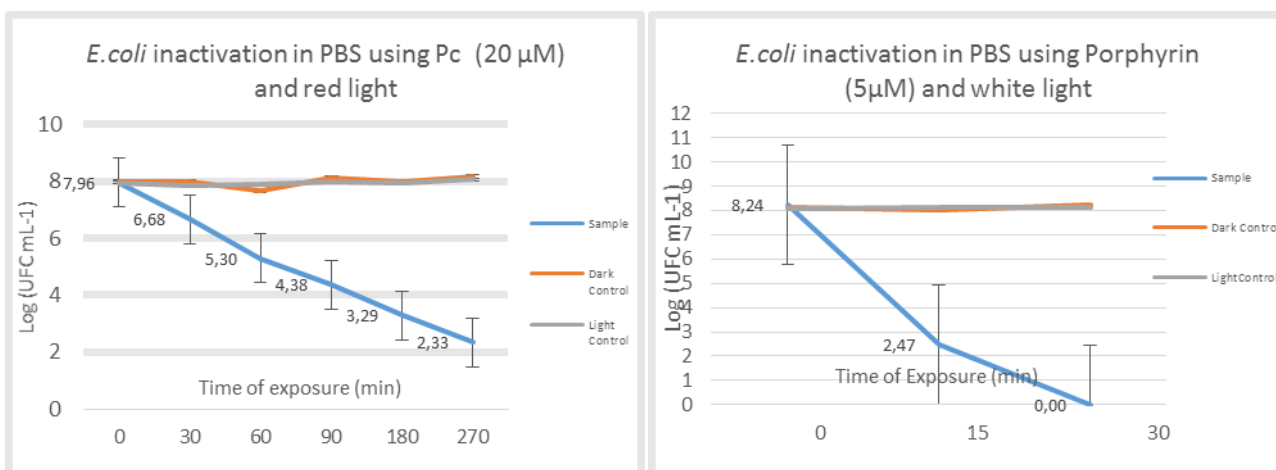
To verify if there were any significant differences between the incubation conditions in the experiments (light control; dark control and samples) it was applied the t-test (SPSS 20.0) after verifying if there was a normal distribution of data using the *Kolmogorov-Smirnov* test. With a P-value below 0.05 the null hypothesis (no significant differences between the incubation conditions) was rejected in favour of the alternative hypothesis (there is a significant difference between the incubation conditions).

Next, it was tested the analysis of variance (ANOVA) to verify if there were any significant differences between among group means. Once, the p value is below the level of significance (0.05), the null hypothesis is rejected and concludes that not all of population means are equal.

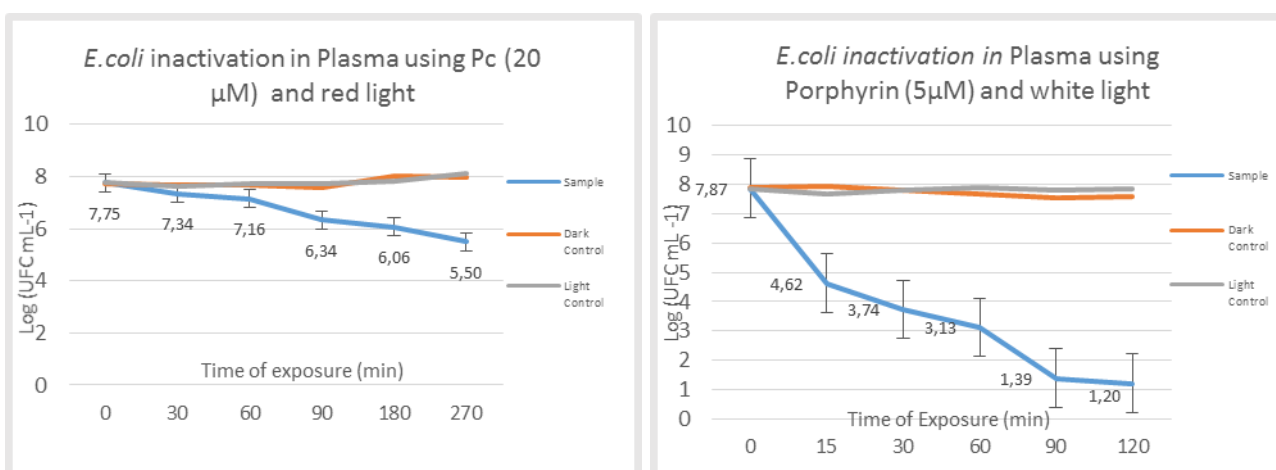
## Results

### Evaluation of the effectiveness of the photosensitizers in the blood components

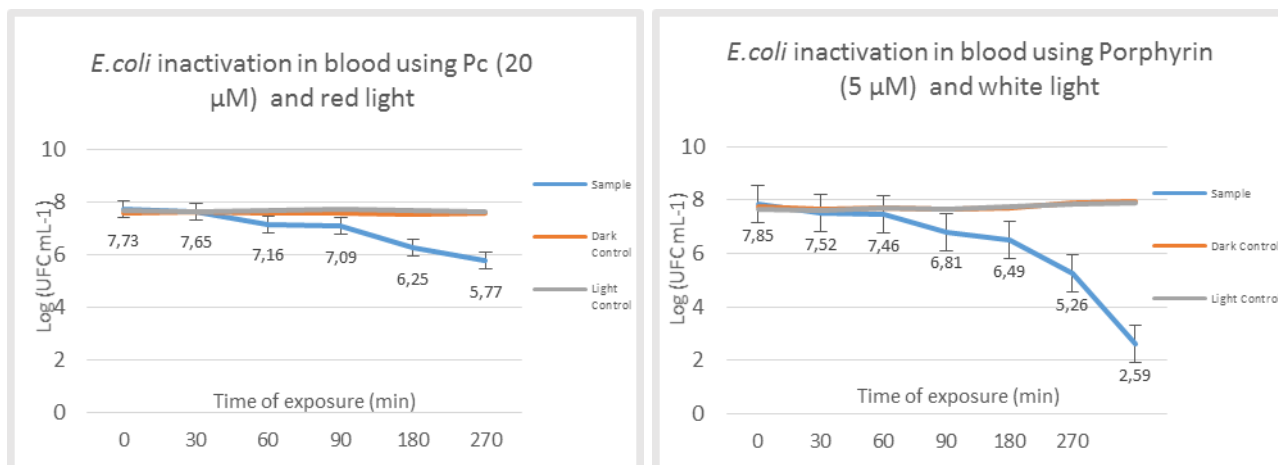
The effectiveness of the photosensitizers it was tested in the red blood cells and plasma and the results was compared with the results obtained in PBS assays.



**Figure 1:** The graphics indicated the results of *E. coli* inactivation in PBS using the **Pc** (20 µM) and **Por** (5 µM) exposed to red and white light at an irradiance of 150 mW/cm<sup>2</sup>, respectively. The graphs demonstrate a reduction of the *E. coli* concentration in controls and samples. The values resulted from the average of 3 replicates for each assay.



**Figure 2:** The graphics indicated the results of *E. coli* inactivation in plasma using the **Pc** (20 µM) and **Por** (5 µM) exposed to red and white light at an irradiance of 150 mW/cm<sup>2</sup>, respectively. The graphs demonstrate a reduction of the *E. coli* concentration in controls and samples. The values resulted from the average of 3 replicates for each assay.



**Figure 3:** The graphics indicated the results of *E. coli* inactivation in blood using the **Pc** (20 µM) and **Por** (5 µM) exposed to red and white light at an irradiance of 150 mW/cm<sup>2</sup>, respectively. The graphs demonstrate a reduction of the *E. coli* concentration in controls and samples. The values resulted from the average of 3 replicates for each assay.

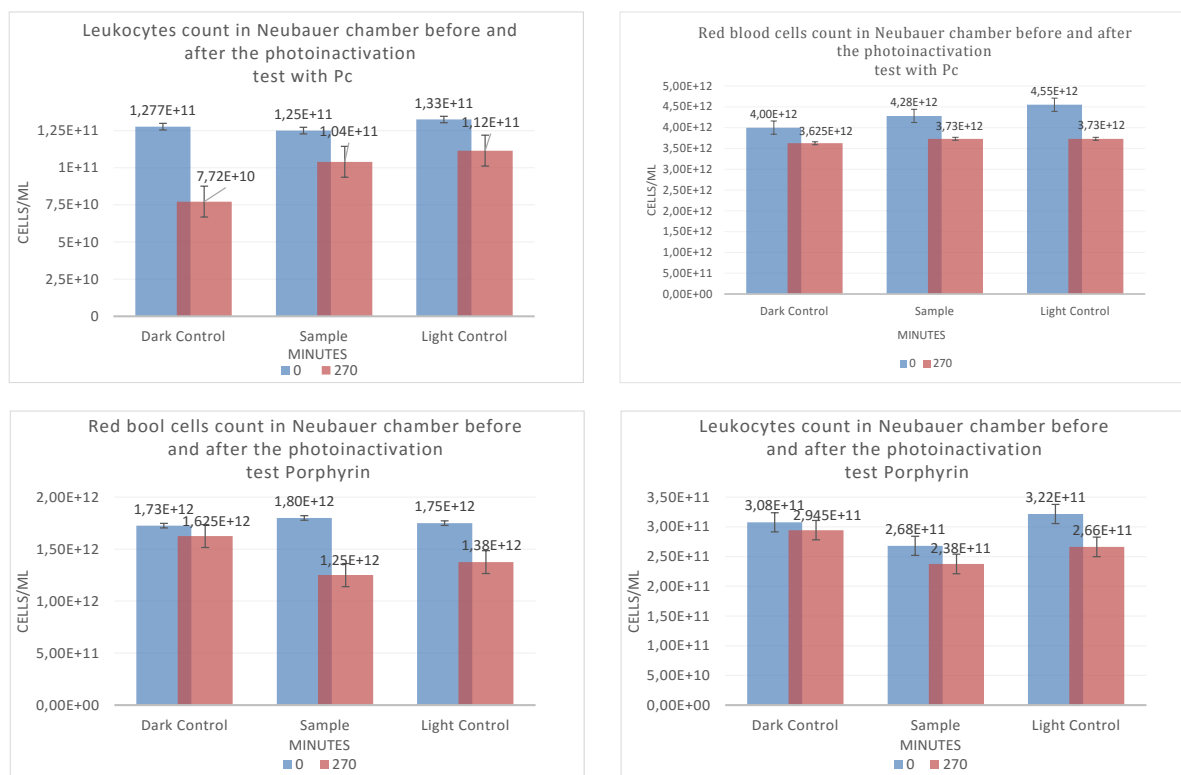
The results show the differences in the effectiveness of *E. coli* inactivation between the two photosensitizers. In PBS, **Pc** (20 µM) reduced the *E. coli* concentration in 5.6 log after 270 min of exposition to red light. On the other hand, **Por** (5 µM) decreased *E. coli* concentration to below the method detection limit after 30 min to exposition of white light. The *E. coli* inactivation using **Pc** (20 µM) in plasma and complete blood was also effective. However, the reduction it was lower than on PBS reducing only 2.0 and 2.5 Log of *E. coli* after 270 min of red light exposition, respectively.

In plasma and complete blood the inactivation using **Por** (5µM) reduced 6.7 and 5.3 log after 120 and 270 min of white light exposition, respectively.

Through further analysis of the charts it can observe the constant behavior of the controls when compared with the samples.

## Evaluation of the aPDT process and photosensitizers effects in the blood cells.

The blood cells were not significantly affected by the aPDT treatment, the differences in cells counts before and after aPDT in the treated samples were similar to those observed in the light control.



**Figure 4:** The graphics indicate the results of cells counting, red blood cells and leukocytes, through the Neubauer chamber method. The cells were counted before and after photoinactivation assay using **PC** (20  $\mu$ M) and **Por** (5  $\mu$ M) exposed to red and white light respectively. The values resulted from the average of 3 replicates for each assay.

The results of cell counts showed a slight decrease in the number of cells after exposure not exceeding values that fall more than 1 log of cells/mL



## Discussion

Photodynamic therapy is currently an important therapeutic option, particularly with antimicrobial photodynamic therapy for the infection treatment. With regard to the elimination or reduction of microbial load in blood and blood products there is still a long way to go. The complexity of the blood matrix as well as the variety of possible microorganisms causing sepsis associated with strong security measures applied in transfusion medicine makes urgent the existence of effective infection methods but also highlighted the difficulty they will have to enter a system already very articulate and governed by standard rules worldwide. Thus, the implementation of new techniques of disinfection has to show stronger, more efficient, significantly contributing to improving the quality control system of transfusion medicine.

The main objective of this study was to evaluate the potential of new PS to blood and blood component disinfection by photodynamic treatment. As concentrated erythrocytes is a complex matrix, the high number of cell elements coated cell membranes may in some cases enhance non-specific binding of photosensitizers leading to a reduction of its antimicrobial activity. The prospect of a split in this intra and extracellular microorganisms further complicates disinfection task. Moreover, the erythrocytes can be also affected by PDI treatment. In fact, none of the PS approved nowadays to disinfect plasma and platelets is approved to disinfect concentrated erythrocytes due to the negative effects observed in these cells after aPDT (15).

In this study we tested the antimicrobial activity of two different photosensitizer classes, phthalocyanine and porphyrin, in whole blood, plasma and PBS.

aPDT tests in buffer solutions, such as PBS, is extremely important to determine the behavior and the effectiveness of the PS compounds in an environment free from any interference. In PBS both PS were efficient to photoinactivate the bacteria. However, the experimental design was different for the two compounds, namely the type of light to which they were exposed and its final concentration in the test sample. A greater concentration of **Pc** was necessary (20  $\mu\text{M}$ ) to inactivate 6 log of bacteria but a concentration of 5  $\mu\text{M}$  of **Por** was sufficient to inactivate 8 log of bacteria. Although both PS efficiently photoinactivate the bacteria in PBS, the inactivation in plasma and blood was clearly higher when **Por** was used as PS. With **Pc** only 2 log of bacteria were inactivated in both plasma and blood, but with the **Por** 7 and 5 log of bacteria were

inactivated in plasma and blood, respectively. This can be due to a higher adsorption to proteins and/or cell blood by the **Pc** than for the **Por**.

The type of light used for the two PS can also explain the different comportment of both compounds in the different matrices. As the **Pc** have a high absorption band in the red region, red LED was used. However, the red light emission used (620-750 nm) could not complete overlapping the **Pc** Q-band which reduce significantly the number of photons absorbed by the **Pc**. The phthalocyanines in general has also a great tendency to aggregate in water.

The lower inactivation by the **Pc** relatively to the **Por**, can also results in part from a greater tendency to aggregate by the **Pc** when compared to porphyrins. . In fact the phthalocyanines in general has also a great tendency to aggregate in water.(38) Although the studied **Pc** has 8 positive charges and have a strong hydrophilic character, the position of those charges may also contribute to aggregation behaviour in water, once due to its location it is more protected from the surrounding environment.

The porphyrin, despite present a high antimicrobial activity on all tested matrices, its efficiency was not the same. The efficiency of inactivation decreased with the increase in sample complexity. This fact can be explained by the adsorption of the PS to the organic matter of plasma and of the whole blood, which can also limit the light penetration. In fact several studies have showed that the presence of organic matter decreases the efficiency of aPDT (17).

Comparing the results obtained in buffer solution (PBS) with those of blood samples highlight the importance of testing the efficacy of aPDT inactivate bacteria in clinically relevant setting. It is important not only the structure of the PS but also the nature of the samples to treat. The increase in PS concentration and/or treatment period, in general, increase the efficiency of microbial inactivation by aPDT. (18) However, for some PS, such as **Pc**, the aggregation can be an extra problem that should be considered.

The blood cells, including erythrocytes, should not be affected after aPDT treatment in order to maintain their activity in the receptor and so as not to alter the red blood cells and even other cell types of the receptor. In this study, the erythrocytes density was not affected by the aPDT treatment by the two PS.

Problems such as aggregation or the binding of PS to proteins and is a problem evidenced by others PS already used. The MB despite having an effective antimicrobial activity but

cannot activate intracellular microorganisms and white blood cells due to low penetration capability in plasma membranes and their close association to plasma proteins.(8, 9, 34) However, other PS as psoralen and riboflavin, also show a high affinity to associate with the proteins and lipids existing in the plasma. (8, 34)

The same behaviour was also observed for the leucocytes. With these results it can be concluded that the activity of phthalocyanines is lower than that of the porphyrins even these concentrations being 4 times higher. These results suggest that both PS can be candidates to be used in PDI. However, alternative or complement evaluation methods are need to comprove these results. The determination of the membrane fragility of erythrocytes can be a potential method to evaluate the viability of the erythrocytes.

## Capítulo 3: Conclusões

---

- A terapia fotodinâmica constitui, atualmente, uma opção terapêutica importante, sendo particularmente a terapia fotodinâmica antimicrobiana, uma forte opção para o tratamento de infecções e neste caso, para a desinfecção de sangue e hemocomponentes;
- No que se refere à eliminação/redução da carga microbiológica em sangue e seus derivados há ainda um longo caminho a percorrer;
- A porfirina testada revelou boa atividade antimicrobiana em sangue total e plasma. Contudo, mais estudos são necessários para determinar a sua inocuidade assim como determinar a sua atividade em concentrados de plaquetas.

## Bibliografia

---

1. Project OBU. Manual do Uso Ótimo do Sangue 2010.
2. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2004;3(5):406-11.
3. Wainwright M. Pathogen inactivation in blood products. *Curr Med Chem*. 2002;9(1):127-43.
4. Sangue C-AdCd. Manual de Hemoterapia 2011.
5. Wainwright M. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *Int J Antimicrob Agents*. 2000;16(4):381-94.
6. Jain A, Marwaha N, Sharma RR, Kaur J, Thakur M, Dhawan HK. Serial changes in morphology and biochemical markers in platelet preparations with storage. *Asian J Transfus Sci*. 2015;9(1):41-7.
7. Naghadeh HT, Badlou BA, Ferizhandy AS, Mohammadreza TS, Shahram V. Six hours of resting platelet concentrates stored at 22-24 °C for 48 hours in permeable bags preserved pH, swirling and lactate dehydrogenase better and caused less platelet activation. *Blood Transfus*. 2013;11(3):400-4.
8. Solheim BG. Pathogen reduction of blood components. *Transfusion and Apheresis Science*. 2008;39(1):75-82.
9. Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B*. 2009;95(2):71-80.
10. Bihl F, Castelli D, Marincola F, Dood R, Bander V. Transfusion - Transmitted infections 2007; 5:[25 p.].
11. Dhingra N. International challenges of self-sufficiency in blood products. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2013;20(2):148-52.
12. IP IPdSedT. Relatório de Actividade dos Serviços de Sangue e Medicina Transfusional 2012 2012.
13. Portuguesa DdR. Decreto de lei nº267/2007 24 de Julho.
14. Burnouf T, Radosevich M. Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Rev*. 2000;14(2):94-110.

15. Mundt JM, Rouse L, Van den Bossche J, Goodrich RP. Chemical and biological mechanisms of pathogen reduction technologies. *Photochem Photobiol.* 2014;90(5):957-64.
16. Wainwright M. The emerging chemistry of blood product disinfection. *Chem Soc Rev.* 2002;31(2):128-36.
17. Nakonieczna J, Kossakowska-Zwierucho M, Filipiak M, Hewelt-Belka W, Grinholc M, Bielawski KP. Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* using protoporphyrin IX: the role of haem-regulated transporter HrtA. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015.
18. Kaestner L, Juzeniene A, Moan J. Erythrocytes-the 'house elves' of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(11-12):981-9.
19. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):380-7.
20. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):339-52.
21. De Baroid AT, McCoy CP, Craig RA, Carson L, Andrews GP, Jones DS, et al. Optimization of singlet oxygen production from photosensitizer-incorporated, medically relevant hydrogels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015.
22. Yano T, Hatogai K, Morimoto H, Yoda Y, Kaneko K. Photodynamic therapy for esophageal cancer. *Ann Transl Med.* 2014;2(3):29.
23. Skupin-Mrugalska P, Sobotta L, Kucinska M, Murias M, Mielcarek J, Duzgunes N. Cellular changes, molecular pathways and the immune system following photodynamic treatment. *Curr Med Chem.* 2014;21(35):4059-73.
24. Milla Sanabria L, Rodriguez ME, Cogno IS, Rumie Vittar NB, Pansa MF, Lamberti MJ, et al. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1835(1):36-45.
25. FV MCD, Al-Kheraif AA, Qadri T, Hassan MI, Ahmed A, Warnakulasuriya S, et al. Efficacy of photodynamic therapy in the management of oral premalignant lesions. A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014.
26. Sahu K, Sharma M, Gupta PK. Modulation of inflammatory response of wounds by antimicrobial photodynamic therapy. *Laser Ther.* 2015;24(3):201-8.

27. Iqbal Z, Chen J, Chen Z, Huang M. Phthalocyanine-Biomolecule Conjugated Photosensitizers for Targeted Photodynamic Therapy and Imaging. *Curr Drug Metab.* 2015;16(9):816-32.
28. Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule JY, Habraken Y, Agostinis P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(8):1651-9.
29. Ruiz-Gonzalez R, Agut M, Reddi E, Nonell S. A Comparative Study on Two Cationic Porphycenes: Photophysical and Antimicrobial Photoinactivation Evaluation. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):27072-86.
30. Granville DJ, Hunt DW. Porphyrin-mediated photosensitization - taking the apoptosis fast lane. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2000;3(2):232-43.
31. Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(8):721-9.
32. Oelckers S, Ziegler T, Michler I, Roder B. Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red-cell ghost suspensions: concerning a signal component that can be attributed to  $^{1}O_2$  luminescence from the inside of a native membrane. *J Photochem Photobiol B.* 1999;53(1-3):121-7.
33. Ball DJ, Wood SR, Vernon DI, Griffiths J, Dubbelman TM, Brown SB. The characterisation of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitising ability in relation to mTHPC and polyhaematoporphyrin. *J Photochem Photobiol B.* 1998;45(1):28-35.
34. Solheim BG, Seghatchian J. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: an overview. *Transfus Apher Sci.* 2006;35(1):83-90.
35. Sobral PM, Barros AE, Gomes AM, do Bonfim CV. Viral inactivation in hemotherapy: systematic review on inactivators with action on nucleic acids. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(3):231-5.
36. Cerus. Intercept Blood System. 2014.
37. Tormey CA, Santhanakrishnan M, Smith NH, Liu J, Marschner S, Goodrich RP, et al. Riboflavin-ultraviolet light pathogen reduction treatment does not impact the immunogenicity of murine red blood cells. *Transfusion.* 2015.

38. Sekkat N, van den Bergh H, Nyokong T, Lange N. Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics. *Molecules*. 2012;17(1):98-144.
39. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009;6(3-4):170-88.